

1/5/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2006 Thomson Derwent. All rts. reserv.

012016939 \*\*Image available\*\*

WPI Acc No: 1998-433849/ 199837

XRAM Acc No: C98-131226

**New compounds from Zopfiella inermis are sphingosine kinase inhibitors -  
used to treat arteriosclerosis, diabetes, thrombosis, inflammatory and  
autoimmune diseases and cancerous metastasis**

Patent Assignee: SANKYO CO LTD (SANY )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

| Patent No   | Kind | Date     | Applicat No | Kind | Date     | Week     |
|-------------|------|----------|-------------|------|----------|----------|
| JP 10182627 | A    | 19980707 | JP 96341037 | A    | 19961220 | 199837 B |

Priority Applications (No Type Date): JP 96341037 A 19961220

Patent Details:

| Patent No   | Kind | Lan Pg | Main IPC      | Filing Notes |
|-------------|------|--------|---------------|--------------|
| JP 10182627 | A    |        | 8 C07D-311/76 |              |

Abstract (Basic): JP 10182627 A

Compounds of formulae (I) and (II) derived from Zopfiella inermis are new. Also claimed is Zopfiella inermis (Cailleux) Malloch et Cain SANK 15183 strain (FERM BP-5737).

USE - (I) and (II) are sphingosine kinase inhibitors used for preventing and treating arteriosclerosis, diabetes, thrombosis, inflammatory diseases, autoimmune disease, cancerous metastasis and reconstruction after PTCA.

Dwg.0/0

Title Terms: NEW; COMPOUND; SPHINGOSINE; KINASE; INHIBIT; TREAT;  
ARTERIOSCLEROSIS; DIABETES; THROMBOSIS; INFLAMMATION; DISEASE; CANCER;  
METASTASIS

Derwent Class: B02; D16

International Patent Class (Main): C07D-311/76

International Patent Class (Additional): A61K-031/35; C12P-017/06;

C12R-001-01

File Segment: CPI

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-182627

(43)公開日 平成10年(1998) 7月7日

|                          |      |                |     |
|--------------------------|------|----------------|-----|
| (51)Int.Cl. <sup>9</sup> | 識別記号 | F I            |     |
| C 0 7 D 311/76           |      | C 0 7 D 311/76 |     |
| A 6 1 K 31/35            | ABA  | A 6 1 K 31/35  | ABA |
|                          | ABE  |                | ABE |
|                          | ABF  |                | ABF |
|                          | ABN  |                | ABN |

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

|          |                  |         |                                           |
|----------|------------------|---------|-------------------------------------------|
| (21)出願番号 | 特願平8-341037      | (71)出願人 | 000001856<br>三共株式会社<br>東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号 |
| (22)出願日  | 平成8年(1996)12月20日 | (72)発明者 | 河野 圭太<br>東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内         |
|          |                  | (72)発明者 | 田中 勝弘<br>東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内         |
|          |                  | (72)発明者 | 古谷 航平<br>茨城県つくば市御幸が丘33 三共株式会社内            |
|          |                  | (74)代理人 | 弁理士 大野 彰夫 (外2名)                           |

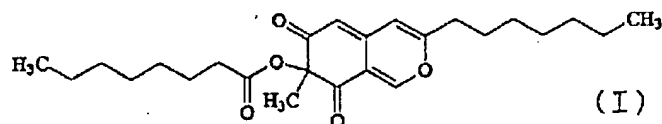
(54)【発明の名称】 新規化合物S-15183a及びS-15183b

(57)【要約】

に対する阻害作用を有する新規化合物を提供する。

【課題】 ソフィエラ・イネルミス・ケイリュウ・マロツク・エト・ケインSANK15183株 (FERM B P-5737) の培養物より、スフィンゴシンキナーゼ

【解決手段】 下記式(I) で表される新規化合物 S-15183

a :  
【化1】

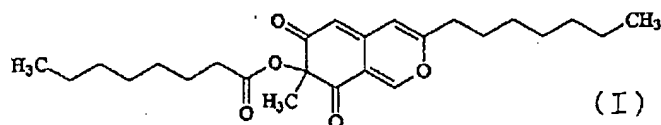
等に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記式(I) で表される新規化合物 S-15183

a :

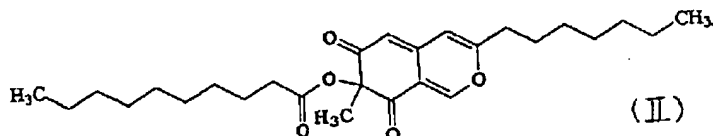
【化 1】



【請求項 2】 下記式(II)で表される新規化合物 S-15183

【化 2】

b :



【請求項 3】 ソフィエラ属に属する S-15183a 及び/又は S-15183b 生産菌を培養し、その培養物より S-15183a 及び/又は S-15183b を採取することを特徴とする S-15183a 及び/又は S-15183b の製造法。

【請求項 4】 S-15183a 及び/又は S-15183b 生産菌がソフィエラ・イネルミス種に属することを特徴とする請求項 3 記載の製造法。

【請求項 5】 S-15183a 及び/又は S-15183b 生産菌が、ソフィエラ・イネルミス・ケイリユー・マロック・エト・ケイン (Zopfiella inermis (Cailleux) Malloch et Cain) SANK 15183 株 (FERM BP-5737) である、請求項 3 または 4 記載の製造法。

【請求項 6】 ソフィエラ・イネルミス・ケイリユー・マロック・エト・ケイン (Zopfiella inermis (Cailleux) Malloch et Cain) SANK 15183 株 (FERM BP-5737)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、スフィンゴシンキナーゼ阻害剤として有用な新規化合物 S-15183a および S-15183b 並びにその製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】 スフィンゴ脂質は従来、グリセリン脂質およびコレステロールとならぶ細胞膜の主要な構成成分の一つと考えられてきた。グリセリン脂質は細胞膜構造の維持だけでなく、その代謝産物として多くの生理活性物質を産生させることが知られてきた。しかし、スフィンゴ脂質についてはその代謝産物の生理活性については最近までほとんど知られていなかった。近年、セラミドなどのさまざまなスフィンゴ脂質の代謝産物にアポトーシスの誘導や細胞増殖刺激作用などの生理活性が知られる様になり、スフィンゴ脂質の代謝酵素が生理的反応や種々の病態の原因に密接に関連する可能性が示唆されるようになった (Hannun Y. A. and Obeid L. M., (1995) TIBS, 20, 73-77 参照)。

【0003】 スフィンゴ脂質の代謝酵素には、細胞膜の

主要な構成成分であるスフィンゴミエリンを中心として、その生合成に働くもの、分解に働くもの、さらにガングリオシドなどの糖脂質の合成、分解に働くものなど、さまざまな酵素が知られている。スフィンゴシンキナーゼは、スフィンゴ脂質の分解系に作用する酵素であり、スフィンゴシンをリン酸化し スフィンゴシン-1-リン酸を生成させる酵素である。本酵素の基質や生成物であるスフィンゴシンやスフィンゴシン-1-リン酸についてもまた、最近多くの生理活性が報告されるようになった。

【0004】 基質であるスフィンゴシンについてはプロテインキナーゼ C (以下、「PKC」という。) を阻害することが知られており、PKC の活性化剤であるホルボールエステルの作用を多くの細胞系で打ち消すことが明らかになっている。たとえば、ホルボールエステルにより引き起こされた血小板凝集や、好中球の活性化、白血病細胞の分化などがスフィンゴシンにより抑制される (Hannun Y. A. and Corinne M. L., (1993) Biochimica et Biophysica Acta, 1154, 223-236 参照)。

【0005】 またスフィンゴシンはその他種々の情報伝達経路に対して作用することも知られている (Hannun Y. A. and Corinne M. L., (1993) Biochimica et Biophysica Acta, 1154, 223-236 参照)。これらの情報伝達経路は癌の進展、免疫、炎症、糖代謝、血液凝固などの反応に密接に関連することが知られている。

【0006】 また、ある種の白血病細胞においては、網膜芽腫遺伝子産物 (retinoblastomagenic product) を介する増殖抑制経路を、スフィンゴシンが活性化することが知られている。スフィンゴシンのこの作用は PKC の阻害作用とは無関係であり、網膜芽腫遺伝子産物を脱リン酸化して活性化し、細胞を細胞周期の G0/G1 期に留めることにより、白血病細胞の増殖を抑制する (Hannun Y. A. and Corinne M. L., (1993) Biochimica et Biophysica Acta, 1154, 223-236 参照)。

【0007】 一方、スフィンゴシン-1-リン酸には、繊維芽細胞に対して増殖刺激作用が認められる。血小板増

殖因子（以下「PDGF」という）や血清の繊維芽細胞増殖刺激作用は、セカンドメッセンジャーとしてのスフィンゴシン-1-リン酸の作用を介したものであることが最近明らかになった（Olivera A. and Spiegel S., (1993) *Nature*, 365, 557-560 および Spiegel S. et al., (1994) *Breast Cancer Research and Treatment* 31, 337-348 参照）。本作用もPKCの阻害作用とは無関係と考えられている。繊維芽細胞以外の細胞では平滑筋細胞において、スフィンゴシンが細胞増殖作用を示すことが知られており（Jacobs L. S. and Kester M., (1993) *Am. J. Physiol.*, 265, C740-C747 参照）、繊維芽細胞と同様の作用機作で細胞増殖が調節されていることが示唆される。

【0008】またスフィンゴシン-1-リン酸は、ヒト血小板中に多く含まれ、トロンビンやコラーゲン刺激による血小板活性化の際に血小板外に放出され、血小板の凝集反応をさらに活性化することが最近になって明らかとなった（Yatomi Y. et al., (1995) *Blood*, 86, 193-202 参照）。

【0009】スフィンゴシン-1-リン酸のその他の作用としては、ホスホリパーゼDの活性化、細胞内カルシウムイオンプールからのカルシウムイオン放出の促進（Spiegel S. et al., (1994) *Breast Cancer Research and Treatment* 31, 337-348参照）、癌細胞の細胞運動とファゴキネシス(phagocytosis)の抑制（Hannun Y. A. and Corinne M. L., (1993) *Biochimica et Biophysica Acta*, 1154, 223-236 参照）などが知られている。

【0010】以上のごとく、スフィンゴシンやスフィンゴシン-1-リン酸は確かにさまざまな生理作用を有しており、多くの病態において細胞レベルでのスフィンゴシン-1-リン酸量を調節する物質には有用な薬理作用を有することが期待される。たとえばPDGFは、血管平滑筋細胞の増殖と遊走を刺激することを介して血管病変の進展に重要な役割を果たすと考えられているが、該作用機作においてスフィンゴシン-1-リン酸がセカンドメッセンジャーとして働くと考えられている。従って、そのシグナルを遮断すれば、高脂血症における動脈硬化症、糖尿病性血管障害、経皮的冠動脈形成術（以下、「PTCA」という。）後の再狭窄等の予防または治療に有用と考えられる。

【0011】また、スフィンゴシン-1-リン酸に血小板活性化作用が報告されていることから、その生成を妨げれば心疾患など血栓形成を原因とするさまざまな疾患の予防または治療に有用と考えられる。

【0012】さらに、最近、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ(serine palmitoyl transferase)に対する微生物由来の阻害剤がスフィンゴシンに良く似た構造を持ち、しかも強力な免疫抑制作用を持つことが報告された（Sasaki S. et al., (1994) *J Antibiotics*, 47, 420-433 および Miyake Y. et al., (1995) *Biochem. Bio-*

*phys. Res. Comm.*, 211, 396-403 参照）。スフィンゴシンもセリンパルミトイルトランスフェラーゼのダウンレギュレーション作用を有する（Hannun Y. A. and Corinne M. L., (1993) *Biochimica et Biophysica Acta*, 1154, 223-236参照）ことから、スフィンゴシンキナーゼの阻害剤は新たな免疫抑制剤のターゲットになる可能性も考えられる。

【0013】スフィンゴシンやスフィンゴシン-1-リン酸は各種癌細胞に対して、その増殖や遊走に作用することが報告されている（Spiegel S. et al., (1994) *Breast Cancer Research and Treatment* 31, 337-348参照）。癌細胞の種類や条件によって成績はさまざまではあるが、癌の種類によってはスフィンゴシンキナーゼの阻害剤が制癌や転移の阻止に働く可能性も考えられる。

【0014】最近、マスト細胞における免疫グロブリンE (IgE) のシグナル伝達にスフィンゴシンキナーゼが関与することが明らかになりつつある。具体的には、マスト細胞上にあるIgEのFcフラグメントに対するレセプター(FcεRI)を介する細胞内カルシウムイオン濃度([Ca<sup>2+</sup>])の上昇に、スフィンゴシンキナーゼの活性化が深く関与することが報告された（Choi O. H., et al., (1996) *Nature*, 380, 634-636 参照）。従って、スフィンゴシンキナーゼの阻害剤は、抗アレルギー作用を持つことも考えられる。

【0015】以上のことから、スフィンゴシンキナーゼに対する特異的な阻害剤は、抗動脈硬化剤、抗糖尿病剤、抗血栓剤、抗炎症剤、免疫抑制剤、制癌剤、癌転移抑制剤、抗アレルギー剤、経皮的冠動脈形成術(PTCA)後の再狭窄等の予防または治療剤としての開発が有望視される。

【0016】現在、スフィンゴシンキナーゼの阻害剤として知られている物質には、スフィンゴシンの構造類似物質であるジヒドロスフィンゴシンやジメチルスフィンゴシンなどが知られているがその阻害に必要な濃度はそれぞれ20μM、50μMであり（Bornfeldt K. E., et al., (1995) *J Cell Biol.*, 130, 193-206 および Spiegel S. et al., (1994) *Breast Cancer Research and Treatment* 31, 337-348 参照）、また細胞内で代謝されることも十分考えられるため、強力かつ特異的な阻害剤とはいいがたい。また、薬剤としての体内への吸収性や血中での安定性においても問題点が多いと考えられる。このような観点から、スフィンゴシンキナーゼに対して特異的な阻害を示し、かつ新規構造を有する生理活性物質が望まれている。

【0017】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、微生物二次代謝産物中よりスフィンゴシンキナーゼ阻害作用をもつ物質を検索し、ゾフィエラ・イネルミス・ケイリュエ・マロック・エト・ケインSANK15183株（*Zopfella inermis* (Cailleux) Malloch et Cain SANK 15

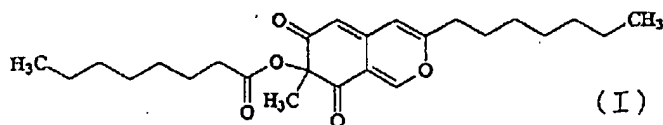
183 : 以下、単に「SANK15183株」という。) (FERM BP-5737) の培養物から、スフィンゴシンキナーゼに対する阻害作用を有する新規化合物 S-15183 a および S-15183 b が生産されることを見出し、本発明を完成した。

【0018】

【課題を解決するための手段】本発明は、(1) 下記式 (I) で表される新規化合物 S-15183a :

【0019】

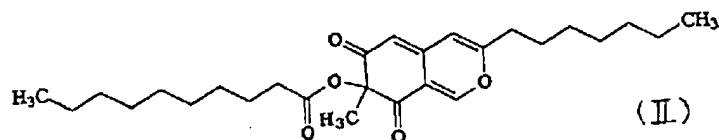
【化3】



【0020】(2) 下記式(II)で表される新規化合物 S-15183b :

【0021】

【化4】



【0022】(3) ソフィエラ属に属する S-15183a 及び/又は S-15183b 生産菌を培養し、その培養物より S-15183a 及び/又は S-15183b を採取することの特徴とする S-15183a 及び/又は S-15183b の製造法、(4) S-15183a 及び/又は S-15183b 生産菌がゾフィエラ・イネルミス種に属することを特徴とする (3) 記載の製造法、(5) S-15183a 及び/又は S-15183b 生産菌が、ゾフィエラ・イネルミス・ケイリュウ・マロック・エト・ケイン (Zopfiella inermis (Cailleux) Malloch et Cain) SANK15183株 (FERM BP-5737) である、(3) または (4) 記載の製造法、(6) ゾフィエラ・イネルミス・ケイリュウ・マロック・エト・ケイン (Zopfiella inermis (Cailleux) Malloch et Cain) SANK15183株 (FERM BP-5737)、に関する。

【0023】本発明の S-15183a および S-15183b は下記の物理化学的性状を有する。

【0024】I. S-15183a

- 1) 性質; 黄色油状物質
- 2) 溶解性; メタノール、酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシド (DMSO) などの有機溶媒に可溶
- 3) 呈色試験; 50% 硫酸、ヨウ素などで陽性
- 4) 分子式;  $C_{25}H_{36}O_5$
- 5) 分子量; 416 (高分解能 FAB-MS 法により 観測値:  $[M+H]^+$  417.2652) (計算値: 417.2641)
- 6) 紫外線吸収スペクトル; (メタノール中) 220 nm ( $\epsilon$  17100), 320 nm ( $\epsilon$  22500), 455 nm ( $\epsilon$  800)
- 7)  $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル; (重クロロホルム中: ppm, テトラメチルシラン基準) 7.88(1H, d,  $J=1.1$ Hz), 6.09(1H, s), 5.52(1H, d,  $J=1.1$ Hz), 2.48-2.38(4H, m), 1.69-1.58(4H, m), 1.52(3

H, s), 1.43-1.23(16H, m), 0.96-0.84(6H, m)

8)  $^{13}C$ -核磁気共鳴スペクトル; (重クロロホルム中: ppm, 重クロロホルム基準)

193.5(s), 192.9(s), 173.1(s), 162.4(s), 154.0(d), 142.7(s), 115.2(s), 108.6(d), 106.8(d), 84.1(s), 33.2(t), 33.1(t), 31.6(t), 28.9(t), 26.5(t), 24.6(t), 22.6(t), 22.2(q), 14.1(q)

(31.6, 28.9, 22.6, 14.1 ppm のシグナルに炭素 2 または 3 個分の重なりがあると考えられる。)

9) 高速液体クロマトグラフグラフィー

保持時間: 5.0分

カラム: ナカライテスク社製 COSMOSIL 5C18AR, 4.6  $\phi$  X 150mm

溶媒: アセトニトリル - 水 9:1

流速: 1ml/分

検出: UV 210nm

10) 比旋光度;  $[\alpha]_D^{25} = -220$  (c 0.2, メタノール)

II. S-15183b

1) 性質; 黄色油状物質

2) 溶解性; メタノール、酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシド (DMSO) などの有機溶媒に可溶

3) 呈色試験; 50% 硫酸、ヨウ素などで陽性

4) 分子式;  $C_{27}H_{40}O_5$

5) 分子量; 444 (高分解能 FAB-MS 法により 観測値:  $[M+H]^+$  445.2959) (計算値: 445.2954)

(計算値: 445.2954)

6) 紫外線吸収スペクトル; (メタノール中)

220 nm ( $\epsilon$  16900), 320 nm ( $\epsilon$  21600), 455 nm ( $\epsilon$  1200)

7)  $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル; (重クロロホルム中: ppm, テトラメチルシラン基準)

7.87(1H, d,  $J=1.1$ Hz), 6.08(1H, s), 5.51(1H, d,  $J=1.1$ Hz), 2.48-2.38(4H, m), 1.74-1.55(4H, m), 1.52(3

H, s), 1.43-1.23(20H, m), 0.95-0.83(6H, m)

8)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル; (重クロロホルム中: ppm, 重クロロホルム基準)

193.5(s), 192.9(s), 173.1(s), 162.4(s), 154.0(d), 142.7(s), 115.2(s), 108.6(d), 106.8(d), 84.1(s), 33.3(t), 33.1(t), 31.9(t), 31.6(t), 29.4(t), 29.3(t), 29.0(t), 28.9(t), 26.6(t), 24.7(t), 22.7(t), 22.6(t), 22.2(q), 14.1(q), 14.05(q)

(29ppm 付近のメチレン炭素シグナルに重なりがあると考えられる。)

9) 高速液体クロマトグラフグラフィー

保持時間: 8分

カラム: ナカライテスク社製 COSMOSIL 5C18AR, 4.6  $\phi$  X150mm

溶媒: アセトニトリル - 水 9:1

流速: 1ml/分

検出: UV 210nm

10) 比旋光度;  $[\alpha]_D^{25} = -227$  (c 0.3, メタノール) S-15183 a および S-15183 b の生産菌の性状

本発明で用いられる SANK 15183 株の形態学的、生理学的性状および化学分類学的性状は以下に示す通りである。

【0025】PDA 上23℃での生育は速やかで、1週間目のコロニーの直径は80mmに達する。コロニーは平たんで薄く、栄養菌糸は表在的または潜在的に発達する。表面は綿毛状で中心部が明褐色で縁辺部に向けて灰褐色となる。裏面は中心部が褐色で縁辺部に向かって淡色となり、縁辺部ではほぼ白色を呈する。裏面と同系色の可溶性色素の分泌が認められる。WSH 上23℃での生育は速やかで1週間目のコロニーの直径は78mmに達する。コロニーは平たんで薄く、栄養菌糸は表在的または潜在的に発達する。表面は綿毛状で灰褐色となる。多量の子のう殻を寒天表面または基質中に形成する。裏面は縁辺部が薄黄色で中心に向かって明褐色になる。表面と同系色の可溶性色素の分泌が認められる。なお、培地の組成は以下の通りである。閉子のう殻は散在性で灰色から灰褐色を呈する。閉子のう殻は直径126-267  $\mu\text{m}$  の球形で、無色から淡黄褐色の半透明の薄い膜質の殻壁でおおわれる。子のうは8 胞子を含み、幅の広い根棒状で、64-103 $\times$ 19-50  $\mu\text{m}$  の大きさである。先端構造は見られず、下部で細くなる。子のう胞子は複列で最初は無色で楕円形であるが、後に基部近くに横断状の隔壁を生じ2 細胞になる。子のう胞子の全長は31.4-38.3  $\mu\text{m}$  である。上部細胞はオリーブ褐色から暗褐色、またはほとんど黒色の幅広い楕円形で、大きさは26.6-31.1 $\times$ 19.3-21.7  $\mu\text{m}$  であり、表面は平滑となる。先端に直径最大で1.6  $\mu\text{m}$  の円形の発芽孔を生じる。下部細胞は4.8-9.74.0-8.1  $\mu\text{m}$  で、無色の薄壁の乳首状から三角錐構造で、しばしばつぶれている。表面は平滑でゼラチン被膜は存在しない。菌糸は無色から淡黄褐色で分枝し、隔壁を持つ。アナモルフは形成されない。

#### 【0026】培地組成

PDA (ポテト・デキストロース・アガー: 以下「PDA」とする。) 培地

39g PDA (ニッスイ製薬(株)製) を水で1リットルとする。

【0027】WSH (ワイツマン・シルヴァ・フトナー: Weitzman Silva-Hutner、以下、「WSH」とする。) 培地

10g のオートミール、1g の硫酸マグネシウム・7水和物、1g のリン酸2水素カリウム、1g の硝酸ナトリウム、1g の寒天を水で1リットルとする (pH無調整)。

【0028】以上の菌学的性状より、本菌に該当するものを検索したところ、Cailleux (1970) および Malloch and Cain (1971) の報告しているゾフィエラ・イネルミス (*Zopfiella inermis*) の記載と一致した (参考文献は以下に記載する。)。よって、本菌をゾフィエラ・イネルミス・ケイリュウ・マロック・エト・ケイン (*Zopfiella inermis* (Cailleux) Malloch et Cain) SANK 15183 と同定した。

#### 【0029】(参考文献)

Cailleux, R. 1970. Champignons stercoraux de Republique Centrafricaine IV.

Tripterospora. Cah. La Maboque 8:5-16

Malloch, C. and Cain, R. F. 1971. New cleistothecial Sordariaceae and a new family, Coniochaetaceae. Can. J. Bot. 49:869-880

SANK 15183株は工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-5737として寄託されている (原寄託日: 平成 8年11月1日)。

#### 【0030】

##### 【発明の実施の形態】

##### 培養法及び精製法

本発明の新菌株を分離するのに際し使用される分離培地としては炭素源、窒素源、無機イオン及び有機栄養源より選択されたものを適宜含有する培地であれば合成または天然培地の何れでも使用可能である。S-15183a および S-15183b は SANK-15183 株を適当な培地で培養し、それから採取することによって得られる。栄養源としては、従来真菌類や放線菌類の菌株の培養に利用されている公知のものが利用できる。例えば、炭素源としては、グルコース、シュークロース、澱粉、グリセリン、水飴、糖蜜、大豆油などが使用できる。また、窒素源としては大豆粉、コーンステープリカー、生イースト、ジャガイモ、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウムなどを使用する。このほか必要に応じて炭酸カルシウム、リン酸塩等の無機塩類を添加するほか、菌株の発育を助け、S-15183a および S-15183b の生産を促進するような有機及び無機物を適当に添加することができる。

【0031】培養法としては、一般の抗生物質を生産する方法と同じく液体培養法、特に深部培養法が適してい

る。培養は好気的条件下で行われ、培養に適当な温度は、18-24℃であるが、多くの場合20℃付近で培養する。S-15183a およびS-15183bの生産は、振とう培養で通常10-12日で最高値に達する。

【0032】培養終了後、培養液中の菌体あるいは上清中に存在するS-15183a およびS-15183bを培養液の容量程度のアセトンあるいはアセトニトリルのような有機溶媒を添加し混合することにより抽出する。抽出物中に存在する固形部分を珪藻土をろ過操作助剤とするろ過操作または遠心分離によって分別し、そのろ液または上清中に存在するS-15183a およびS-15183bを、スフィンゴシンキナーゼ活性を指標にして、その物理的性状を利用し抽出精製する。例えば、この抽出液中に存在するS-15183a およびS-15183bは、まず濃縮操作で混在する有機溶媒を除去した後にpH3程度の酸性条件下で水と混和しない有機溶剤、例えばn-ブタノール、メチルエチルケトン、酢酸エチル、クロロホルム、塩化エチレン、塩化メチレンなどの単独または、それらの組み合わせにより抽出精製することができる。あるいは吸着剤として、例えば活性炭または吸着用樹脂であるアンバーライトXAD-2、XAD-4（ローム アンド ハース社製）などや、ダイアイオンHP-10、HP-20、CHP-20P、HP-50（三菱化成（株）製）などを使用することができる。S-15183a およびS-15183bを含む液を上記のごとき吸着剤の層を通過させて不純物を吸着させて取り除くか、またはS-15183a およびS-15183bを吸着させた後、メタノール水、アセトン水、n-ブタノール水などを用いて溶出させることにより得られる。このようにして得られたS-15183a およびS-15183bは、更にシリカゲル、フロリジルのような担体を用いた吸着カラムクロマトグラフィー、セファデックスLH-20（ファルマシア社製）などを用いた分配カラムクロマトグラフィー、セファデックスG-25（ファルマシア社製）などを用いたゲルろ過クロマトグラフィー、及び順相、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで精製することができる。

【0033】本発明のS-15183a またはS-15183bを動脈硬化症、糖尿病、血栓症、炎症性疾患、自己免疫疾患、癌の進展や転移、経皮的冠動脈形成術(PTCA)後の再狭窄などの予防または治療剤として用いる場合、いろいろな形態で投与される。その投与形態としては例えば錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤等による経口投与または注射剤（静脈内、筋肉内、皮下）などをあげることが出来る。これらの各種製剤は、常法に従って主薬に賦形剤、結合剤、崩壊剤、潤沢剤、溶解剤、矯味矯臭、コーティング剤等既知の医薬製剤分野において通常使用しうる既知の補助剤を用いて製剤化することができる。その使用量は症状、年齢、体重、投与方法および剤形等によって異なるが通常は成人に対して一日10mg乃至1000mgを投与することができる。

【0034】本発明の化合物S-15183a およびS-15183bのスフィンゴシンキナーゼ阻害活性を測定する方法は以下の通りである（Schroepfer J. R. et al., (1970) J Biol. Chem. 245, 3084-3090 参照）。

【0035】即ち、まず、酵素溶液としてウイスターイマミチ系雄性ラットの細胞質可溶性画分を調製する。酵素溶液と、アデノシン三リン酸（以下「ATP」という）、塩化マグネシウム、エチレンジアミン四酢酸（以下「EDTA」という）、メルカプトエタノールを含むリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)、検体溶液、およびプロピレングリコールに溶解した基質（[3-<sup>3</sup>H]-D-エリスロースフィンゴシン（NEN社製）を混合し、37℃で保温することによりスフィンゴシンキナーゼ反応を行う。次に、濃アンモニア水を加えることにより反応を停止させ、クロロホルム：メタノール（2：1、vol/vol）を加えて抽出操作を施し、得られた上層の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定する。スフィンゴシンキナーゼ活性の算出は、上層に移行した放射活性の割合で示すことができる。即ち、基質の<sup>3</sup>H-スフィンゴシンが<sup>3</sup>H-スフィンゴシン-1-リン酸になり、有機層より水層に移行した割合を測定し、酵素活性を算出する。

【0036】なお、スフィンゴシンキナーゼの活性測定は上記以外の方法として基質に放射性の<sup>32</sup>P-ATPを用いるシュビーゲルらの方法（Olivera A. and Spiegel S., (1993) Nature, Vol. 365, 557-560）などいかなる方法を用いても良い。

【0037】

【実施例】次に実施例をあげて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれに限定されない。

【0038】実施例1. S-15183a およびS-15183bの生産

(1) 生産菌の培養

SANK 15183株を、後述する組成の滅菌した培養培地80mlを含む500mlの三角フラスコに無菌的に接種した。次いでこれを8日間、23℃で210rpmのロータリー振とう機で（前培養抜きの直接本培養による）培養を行なった。

【0039】培地組成

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| グリセロール                     | 30 g   |
| グルコース                      | 30 g   |
| 大豆粉                        | 10 g   |
| イースト・エキストラクト               | 2.5 g  |
| 可溶性澱粉                      | 20 g   |
| ゼラチン                       | 2.5 g  |
| 硝酸アンモニウム                   | 2.5 g  |
| 消泡剤<br>(CB-422: 日本油脂（株）社製) | 0.2 mg |

イオン交換水で 1000 ml とした。

【0040】（滅菌前のpH 6.5）

(2) 単離

三角フラスコ 10 本分の培養液約 1L に等量のアセトンを加え 2 時間よく攪拌した。これを pH 3 に調製し、2L の酢酸エチルで3 回抽出した。酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧濃縮して褐色油状物質 1.2g を得た。これを少量のヘキサン-酢酸エチル、5:1 の溶媒に溶解し、同じ溶媒で平衡化した100ml のシリカゲルカラムに供与した。このカラムを1 Lのヘキサン-酢酸エチル、5:1 の溶媒で溶出し分画した。酵素阻害活性の認められた分画を濃縮したところ、210mg の橙色物質を得た。これを少量のメタノールに溶解し、以下のように調製用 HPLC で精製した。すなわち、約 20mg ずつ、アセトニトリル - 水 9:1 の溶液で平衡化した HPLC カラム (Senshu Pak, PE GASIL 20φX 60 mm) にチャージし、同じ溶媒で、6 ml / 分の流速で展開した。210 nm の吸収を検出し、約 8 分に溶出されるピーク (S-15183a に相当する。)、約 13 分に溶出されるピーク (S-15183b に相当する。) をそれぞれ分取した。分取した溶液を減圧濃縮して溶媒を留去したところ、S-15183a および S-15183b をそれぞれ 140mg、20 mg 得た。

【0041】試験例. スフィンゴシンキナーゼ阻害活性の測定

#### (1) 酵素液の調製

スフィンゴシンキナーゼの酵素源としてラット肝臓を用い、まず以下のようにその細胞質可溶性画分を調製した。4 匹のウイスターイマミチ系雄性ラット (12週令) を頸動脈放血後、肝臓を摘出した。摘出した肝臓を0.15 M の塩化ナトリウム水溶液で軽く濯ぎ、細かくスライスした後、予め4 °C に冷却した0.1 M のリン酸バッファー (pH7.4) 80ml を加え、4 °C 条件下、ポッターのホモジナイザーを用いて肝細胞の破碎を行った。次に、得られた細胞破碎液を4 °C 条件下、500xg、15分の遠心分離を行い、上清を更に、4 °C 条件下、10,000xgで30分間の遠心分離を行った。得られた上清を4 °C 条件下、105,000xgで60分間の超遠心分離を行った。その上清を用いて更に硫酸分画を行い、25%飽和から55%飽和の間で沈殿する画分を回収した。得られた沈殿を予め4 °C に冷却したバッファーA (1mM EDTA、1mM メルカプトエタノール、20

%グリセロール、0.1M リン酸カリウム緩衝液、pH7.4) 20ml に溶解した。その溶液をバッファーA 中で一晚透析し、得られた溶液を酵素溶液とした。この酵素溶液はスフィンゴシンキナーゼの活性測定時まで-80 °C にて凍結保存し、使用時にバッファーA で蛋白質濃度0.5mg/ml になる様に調製した。

#### 【0042】(2) 酵素阻害活性の測定

スフィンゴシンキナーゼの阻害活性の測定は、シェファ-らの方法 (Schroepfer J. R. et al, (1970) J Biol. Chem. 245, 3084-3090 参照) に準じて、ラット肝臓細胞質可溶性画分を酵素源に、[3-<sup>3</sup>H]-D- エリスロー スフィンゴシン (NEN社製) を基質に用いて行った。即ち、先ず、酵素溶液 (蛋白質濃度0.5 μg/ml) 100μl、バッファーB (10mM ATP、20mM 塩化マグネシウム、1mM EDTA、1mM メルカプトエタノール、0.1M リン酸カリウム緩衝液、pH7.4) 100 μl、微生物より抽出した検体10 μl 並びにプロピレングリコールに溶解した基質(3-<sup>3</sup>H-スフィンゴシン)10 μl を混合し、37°Cで20分、インキュベートすることによりスフィンゴシンキナーゼ反応を行った。次に、濃アンモニア水50 μl を加えることにより反応を停止させ、クロロホルム:メタノール (2:1, vol/vol) を750 μl 加えて抽出操作を施し、得られた上層70 μl を96穴プレート (ルーマプレート:パッカー社製) に加えて一晚放置し乾燥させた後、96穴プレート用液体シンチレーションカウンター (トップカウント:パッカー社製) にて放射活性を測定した。スフィンゴシンキナーゼ活性の算出は、上層に移行した放射活性の割合で示した。即ち、基質の<sup>3</sup>H- スフィンゴシンが<sup>3</sup>H- スフィンゴシン-1- リン酸になり、有機層より水層に移行した割合を測定し、酵素活性を算出した。なお、系に加えた基質は一定であるので、上層のみの放射活性を測定することにより酵素活性は算出される。

【0043】この方法で測定した、スフィンゴシンキナーゼ反応を50%阻害するのに必要なS-15183 a および S-15183 b の濃度はそれぞれ3.0 μg/ml, 2.0 μg/mlである。

#### 【0044】

#### 剤例 1. カプセル剤

##### 処方

|              |       |    |
|--------------|-------|----|
| S-15183a     | 100   | mg |
| 乳糖           | 100   | mg |
| トウモロコシ澱粉     | 148.8 | mg |
| ステアリン酸マグネシウム | 1.2   | mg |
| 全量           | 350   | mg |

#### 【0045】

【発明の効果】本発明のS-15183 a およびS-15183bおよびその塩は、動脈硬化症、糖尿病、血栓症、炎症性疾

患、自己免疫疾患、癌の進展や転移、経皮的冠動脈形成術(PTCA)後の再狭窄などの予防または治療剤として用いることができる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

A 6 1 K 31/35

識別記号

A B X

A C B

A D P

A D U

A E D

F I

A 6 1 K 31/35

A B X

A C B

A D P

A D U

A E D

C 1 2 P 17/06

C 1 2 P 17/06

//(C 1 2 P 17/06

C 1 2 R 1:01)